

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
8 janvier 2004 (08.01.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/002227 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
A01N 63/04, 63/00 // (A01N 63/04, 63:04, 63:00)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2003/002039

(22) Date de dépôt international : 1 juillet 2003 (01.07.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
02/08212 1 juillet 2002 (01.07.2002) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : UNI-
VERSITÉ DE BOURGOGNE [FR/FR]; Maison de
l'Université, Esplanade Erasme, B.P. 27877, F-21078
Dijon Cedex (FR).

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement) : PAUL,
Bernard [FR/FR]; 646, rue de Moirey, F-21850 Saint
Apollinaire (FR).

(74) Mandataires : PEAUCELLE, Chantal etc.; Cabinet Ar-
mengaud Aine, 3, avenue Bugeaud, F-75116 Paris (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont re-
çues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abrégiactions" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: MEANS FOR BIOLOGICALLY CONTROLLING CRYPTOGRAMIC PLANT DISEASES

(54) Titre : MOYENS DE LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE LES MALADIES CRYPTOGRAMIQUES DES VEGETAUX

(57) Abstract: The invention concerns the application of compositions of micro-organisms in biological control of vine cryptogamic diseases. Said composition comprises a mixture of at least one bacterium and at least one yeast, the bacterium or bacteria and the yeast(s) being non-toxic for the plant. The invention also concerns bacterial and yeast strains, as well as biofungicide formulations containing an efficient amount of at least one composition of micro-organisms including in mixture at least one bacterium and one yeast, the bacterium or bacteria and the yeast(s) being non-toxic for the plant, and a composition of filamentous fungi, in particular of the genus *Pichia*, *Pythium*, *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Ampelomyces*, *Talaromyces*, *Epicoccum*, combined with an inert carrier. The invention is useful for treating cryptogamic plant diseases, in particular crop plants and vine.

(57) Abrégé : L'invention concerne l'application de compositions de microorganismes en lutte biologique contre les maladies cryptogamiques de la vigne. Cette composition comprend en mélange au moins une bactérie et au moins une levure, la ou les bactéries et la ou les levures étant non toxiques pour le végétal. Elle vise également des souches bactériennes et de levures, ainsi que des préparations biofongicides renfermant une quantité efficace d'au moins une composition de microorganismes comprenant en mélange au moins une bactérie et au moins une levure, la ou les bactéries et la ou les levures étant non toxiques pour le végétal, ainsi qu'une composition de champignons filamenteux, en particulier du genre *Pichia*, *Pythium*, *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Ampelomyces*, *Talaromyces*, *Epicoccum*, en association avec un véhicule inerte. Application pour le traitement des maladies cryptogamiques des végétaux, notamment des plantes cultivées et de la vigne.

WO 2004/002227 A1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Moyens de lutte biologique contre les maladies
cryptogamiques des végétaux

L'invention vise des moyens, à savoir des compositions et des méthodes, de lutte biologique contre les maladies cryptogamiques des végétaux, c'est-à-dire provoquées par des champignons pathogènes.

5 La lutte biologique, c'est-à-dire l'utilisation de microorganismes vivants pour combattre les maladies des plantes, suscite un grand intérêt compte tenu des problèmes croissants posés par l'emploi des fongicides chimiques en agriculture. Les nappes phréatiques polluées, les sols
10 contaminés, et la résistance des champignons pathogènes aux fongicides sont en effet autant de défis à surmonter pour l'agriculture moderne.

Dans le domaine viticole par exemple, il s'impose de produire des vins de qualité toujours plus élevée et de
15 réduire les pollutions occasionnées par l'utilisation intensive de produits chimiques.

Des bactéries, comme *Bacillus Thuringiensis*, ou des champignons, comme *Beauveria* ou *Endothia*, ont déjà été proposés comme moyens de lutte biologique.

20 Or des moyens de grande efficacité et dépourvus de toxicité ont pu être développés par les inventeurs en utilisant des microorganismes en mélange pour lutter contre les maladies cryptogamiques de la vigne. De tels mélanges, non seulement agissent en synergie dans la lutte biologique

recherchée, mais exercent en outre, avec avantage, un effet éliciteur.

En outre, il est apparu que des mélanges particuliers de microorganismes étaient particulièrement efficaces pour le traitement des maladies cryptogamiques des végétaux en général.

L'invention a donc pour but l'application de microorganismes en lutte biologique contre les maladies cryptogamiques de la vigne.

Elle vise également à fournir de nouvelles compositions de microorganismes et leur application comme moyens de lutte biologique contre les maladies cryptogamiques des végétaux, plus spécialement des plantes cultivées.

L'application de compositions de microorganismes en lutte biologique contre les maladies cryptogamiques de la vigne est caractérisée en ce qu'elle comprend en mélange au moins une bactérie et au moins une levure, la ou les bactéries et la ou les levures étant non toxiques pour le végétal.

De manière avantageuse, la ou les bactéries sont choisies dans les groupes *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia* ou *Streptomyces*.

Il s'agit en particulier de bactérie(s) de l'espèce *Bacillus megaterium*, et tout spécialement de la souche déposée le 20 Juin 2002 à la CNCM, 25 rue du Dr. Roux, 75724 Paris Cedex 15, sous le N°I-2897 et de bactérie(s) de l'espèce *Bacillus subtilis* déposée le 20 juin 2002 à la même Institution sous le n° I-2940.

La ou les levures des compositions de l'invention sont avantageusement du genre *Debaryomyces* ou *Pichia*. Il s'agit en particulier de la levure du genre *Debaryomyces* déposée le 20 Juin 2002 à la CNCM sous le N°I-2896..

5 L'invention vise en particulier, en tant que nouveaux produits isolés, la souche de *Bacillus megaterium* (BP B-01) déposée le 20 Juin 2002 à la CNCM, 25 rue du Dr. Roux, 75724 Paris Cedex 15, sous le N°I-2897 et la souche de *Bacillus subtilis* (BP B-10) déposée à la CNCM le 20 juin 2002 sous le
10 n°I-2940..

L'invention vise également, en tant que nouveau produit isolé, la levure du genre *Debaryomyces* (BP Y-01) déposée le 20 juin 2002 à la CNCM sous le n°I-2896.

15 Les souches de bactéries et de levures de l'invention sont avantageusement sélectionnées à partir de microorganismes du sol ou prélevées sur le végétal à traiter. Elles ne perturbent donc pas l'équilibre biologique de l'écosystème puisqu'elles en sont issues.

20 Les compositions de ces microorganismes permettent de traiter les principales maladies fongiques des végétaux et sont donc particulièrement appropriées pour élaborer des préparations biofongicides.

25 Des préparations de l'invention sont caractérisées en ce qu'elles renferment une quantité efficace d'au moins une composition de microorganismes comprenant en mélange au moins une bactérie et au moins une levure, la ou les bactéries et la ou les levures étant non toxiques pour le végétal, ainsi

qu'une composition de champignons filamenteux, en particulier du genre *Pichia*, *Pythium*, *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Ampelomyces*, *Talaromyces*, *Epicoccum* en association avec un véhicule inerte.

5 Le véhicule utilisé est notamment capable d'assurer une bonne dispersion et adhésion des microorganismes sur la partie aérienne de la plante.

Des préparations biofongicides préférées sont caractérisées en ce qu'elles renferment une quantité efficace
10 des souches bactériennes et de la souche de levure déposées à la CNCM, tel que défini plus haut. De manière préférée, les préparations biofongicides de l'invention sont caractérisées par des concentrations en levures de 0,5 à $0,75 \times 10^{10}$ et en bactéries de 0,30 à $0,50 \times 10^{10}$.

15 Ces préparations présentent un large spectre d'efficacité face aux champignons pathogènes et sont avantageusement utilisées pour le traitement des maladies cryptogamiques des végétaux, notamment des plantes cultivées, en particulier des parties aériennes par exemple vigne, tomate, fraise, blé,
20 pomme de terre, tabac, canne à sucre, maïs, riz, arbres fruitiers, de tubercules par exemples de pommes de terre ou de betterave.

L'efficacité a été également particulièrement remarquée sur les plantes maraîchères.

25 Elles sont appliquées par exemple au traitement de l'oïdium, du mildiou, et du *Botrytis* de la vigne, ainsi que des maladies du bois (esca ou eutypa).

Ces préparations présentent également l'avantage d'exercer un effet d'éliciteur qui se traduit par une activation des défenses naturelles de la plante contre les agresseurs d'origine fongique.

5 Les traitements sont effectués notamment par pulvérisation sur les parties aériennes avec des préparations renfermant la ou les bactéries et la ou les levures, avec des quantités modulables selon la pression des pathogènes. Des préparations appropriées renferment par exemple lesdites
10 bactéries et levures dans un rapport d'environ 50/50%.

On notera que l'application de ces traitements ne nécessite aucun changement de matériel de la part de l'utilisateur.

Selon une disposition supplémentaire de l'invention, le
15 traitement est complété le cas échéant à l'aide d'une composition de champignons, plus spécialement de champignons filamenteux, en particulier du genre *Pythium*, *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Ampelomyces*, *Talaromyces*, *Epicoccum*.

Après l'application, les souches de la préparation ne
20 restent que quelques jours sur la plante avant de mourir et de se dégrader. Leur présence dans le sol n'est pas supérieure à un taux normalement constaté et est nulle au-delà de trente centimètres de profondeur.

Ces mélanges de microorganismes n'apportent donc aucune
25 nouvelle forme de pollution.

L'invention vise également la mise à profit de l'effet éliciteur des mélanges de microorganismes de l'invention pour

produire des composés d'intérêt, comme le resvératrol, molécule présentant notamment un effet protecteur du système cardiaque, ou encore le ptérostilbène, en quantités plus élevées que celles produites par la vigne à la suite d'une
5 élicitation telle que celle produite par Botrytis.

L'invention vise ainsi un procédé de production de resvératrol et/ou de ptérostilbène, comprenant l'application à un végétal, notamment la vigne, d'une composition de microorganismes telle que définie plus haut, et la
0 récupération du resvératrol et/ou de ptérostilbène par exemple par extraction.

Le resvératrol est utilisable pour la fabrication de médicaments notamment à visée cardio-vasculaire, en cosmétologie ou comme nutriment. Le ptérostilbène est
5 utilisable comme antifongique.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans les exemples qui suivent donnés aux fins d'illustration de l'invention et en se reportant à figure unique qui présente la production de resvératrol avec
0 différentes combinaisons de bactéries et/ou levures et/ou champignons.

Exemple I : Isolement et culture de la souche de bactéries BP B01 et de la levure BP Y01 :

L'isolement est réalisé comme suit :

5 Les deux microorganismes sont cultivés sur un milieu nutritif solide le PDA (Potato dextrose agar). Les deux microorganismes sont ensemencés séparément dans des

fermenteurs de 20 litres contenant du PDB (Potato dextrose broth). Les levures sont cultivées à 28°C et les bactéries à 37°C. Les microorganismes ainsi préparés sont centrifugés et le culot de bactéries et levures est récupéré séparément dans l'eau distillée stérile. Au moment du traitement du végétal, les deux microorganismes sont mélangés. Le vignoble subit trois traitements par mois, d'avril à août, donc un total de 10 à 12 traitements par le mélange de l'invention pour la saison. Le produit préparé par fermentation est utilisé pour toute la saison, chaque litre contenant de $0,5-0,75 \times 10^{10}$ pour les levures et $0,30-0,50 \times 10^{10}$ pour les bactéries, à raison de 1 litre par pied de vigne.

Caractérisation de l'ADN génomique de BP B01 et de BP B10

L'isolement de l'ADN génomique de BP B01 et de BP B10, ainsi que l'amplification de leur zone ITS, entre les gènes 16S et 23S a été réalisée selon Chen, W. Schneider RW, et Hoy J.W. 1992, Phytopathology, 82, p 1234-1244. Les séquences correspondantes SEQ ID N°1 et SEQ ID N°3 ont été déposées au GENBANK (N° d'accès respectifs AY 125961 et AY 157575).

La levure BP Y01 a été isolée de baies de raisins provenant de différents vignobles de la région de Bourgogne.

L'ADN génomique de BP Y01 a été isolé et la zone ITS, entre les gènes 18S et 28S amplifiée selon les méthodes ci-dessus.

Le fragment ITS1 se trouve entre les gènes 18S et 5,8 S, tandis que ITS2 se trouve entre les gènes 5,8 S et 28 S. La

séquence SEQ ID N°2 a été déposée au GENBANK (N° d'accès AY 125962).

Résultats de lutte biologique sur le cépage chardonnay en 1999 et 2000 au Centre Expérimental de Marsannay - La Côte, France (Université de Bourgogne)

Année :1999	Résultats
Nombre de pieds	450
témoins non traités	10
Nombre de traitements	15
Type d'inoculum	Bactéries + Levures
Protection	39 pieds malades (Mildiou), <i>O Botrytis</i>
Témoins	Mildiou puis <i>Botrytis</i> sur tous les pieds, intervention chimique

Année :2000	Résultats
Nombre de pieds	241
Nombre de traitements	14
Type d'inoculum	Bactéries + Levures
Protection	27 pieds malades (Mildiou), <i>O Botrytis</i>
Témoins	Mildiou puis <i>Botrytis</i> sur tous les pieds

Résultats de lutte biologique sur le cépage pinot-noir en 2000 et 2001 au Centre Expérimental de Marsannay - La Côte, France (Université de Bourgogne)

Année :2000	Résultats
Nombre de pieds	120
témoins non traités	13
Nombre de traitements	14
Type d'inoculum	Bactéries + Levures
Témoins	Mildiou puis <i>Botrytis</i> sur tous les pieds
Protection	11 pieds malades (Mildiou), <i>O Botrytis</i>

Année :2001	Résultats
Nombre de pieds	614
Nombre de traitements	13

Traitement chimique	02
témoins non traités	13
Type d'inoculum	Bactéries + Levures
Témoins	Mildiou + <i>Botrytis</i> sur tous les pieds
Protection	53 pieds malades (Mildiou); qqques grappes infectées par <i>Botrytis</i>
Rendement	1,18 kg de raisin par pied au lieu de 1,2-1,5 kg

10

De manière générale, on note, en plus de l'effet fongicide et d'éliciteur des préparations utilisées, une amélioration de la qualité de la vendange. On constate notamment une augmentation de la concentration en sucre qui permet de réduire ou d'éviter la chaptalisation. De plus, le taux de resvératrol est augmenté. Enfin, les taux de tanin et d'anthocyanes sont en augmentation, ce qui accorde une meilleure charpente et une couleur plus vive au vin.

Les résultats concernant l'augmentation de resvératrol sont illustrés par l'histogramme de la figure unique qui donne en ug/gm de poids frais la production de resvératrol au 3^{ème} jour après addition respectivement de : BP Y01 (levure déposée à la CNCM); BP B01 (bactérie déposée à la CNCM); BC 03 (*botrytis cinerea*); BP Y01 + B C03; BPB 01 + B C03; BP Y01 + BP B01; BP B01 + BP Y01 + B C03.

L'examen de cet histogramme montre que la formation de resvératrol augmente lorsqu'on ajoute le mélange levure/bactérie de l'invention au champignon *Botrytis*.

Compte tenu de l'ensemble de ces propriétés, les compositions utilisées comme préparations fongicides, selon l'invention, constituent une réponse particulièrement

satisfaisante aux problèmes fongiques posés aux cultivateurs, notamment aux viticulteurs et à l'impératif de réduction des pollutions d'origine agricole en constituant des substituts aux produits chimiques.

REVENDICATIONS

1.- Application de compositions de microorganismes en
5 lutte biologique contre les maladies cryptogamiques de la
vigne, caractérisée en ce qu'elle comprend en mélange au moins
une bactérie et au moins une levure, la ou les bactéries et la
ou les levures étant non toxiques pour le végétal.

2.- Application selon la revendication 1, caractérisée en
10 ce que la ou les bactéries sont choisies dans les genres
Bacillus, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Streptomyces*.

3.- Application selon la revendication 2, caractérisée en
ce que la ou les bactéries sont de l'espèce *Bacillus*
megaterium et/ou de l'espèce *Bacillus subtilis*.

15 4.- Application selon l'une quelconque des revendications
1 à 3, caractérisée en ce que la ou les levures sont du genre
Debaryomyces ou *Pichia*.

20 5.- Souche bactérienne, caractérisée en ce qu'il s'agit
de la souche de *Bacillus megaterium* (BP B-01) déposée le 20
juin 2002 à la CNCM sous le N°I-2897.

6.- Souche bactérienne, caractérisée en ce qu'il s'agit
de la souche de *Bacillus subtilis* (BP B-10) déposée le 20 juin
2002 à la CNCM sous le n° I-2940.

25 7.- Souche de levure, caractérisée en ce qu'il s'agit de
la levure du genre *Debaryomyces* (BP Y-01) déposée le 20 Juin
2002 à la CNCM sous le N°I-2896.

8.- Préparation biofongicide, caractérisée en ce qu'elle renferme une quantité efficace d'au moins une composition de microorganismes comprenant en mélange au moins une bactérie et au moins une levure, la ou les bactéries et la ou les levures étant non toxiques pour le végétal, ainsi qu'une composition de champignons filamenteux, en particulier du genre *Pichia*, *Pythium*, *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Ampelomyces*, *Talaromyces*, *Epicococcum*, en association avec un véhicule inerte.

9.- Préparation biofongicide selon la revendication 8, caractérisée par des concentrations en levures de 0,5 à $0,75 \times 10^{10}$ et en bactéries de 0,30 à $0,50 \times 10^{10}$.

10.-Préparation biofongicide, caractérisée en ce qu'elle renferme une quantité efficace d'un mélange des souches selon les revendications 5 à 7.

11.- Application d'une préparation selon l'une des revendications 8 à 10, au traitement des maladies cryptogamiques des végétaux, notamment des plantes cultivées, en particulier des parties aériennes par exemple vigne, tomate, fraise, blé, tabac, canne à sucre, maïs, riz, arbres fruitiers, de tubercules par exemples de pommes de terre ou de betterave.

12.- Application d'une préparation selon l'une des revendications 8 à 10 au traitement de l'oïdium, du mildiou ou du *Botrytis* de la vigne, et d'*eutypa* et esca.

13.- Application selon la revendication 11 ou 12, caractérisée en ce qu'elle comprend un traitement notamment par pulvérisation avec la ou les bactéries et la ou lesdites

levures, selon la pression des pathogènes, notamment selon un rapport d'environ 50/50%.

14.- Application selon l'une quelconque des revendications 11 à 13, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un traitement à l'aide d'une composition de champignons filamenteux, en particulier du genre *Pichia*, *Pythium*, *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Ampelomyces*, *Talaromyces*, *Epicoccum*.

15.- Application de la préparation biofongicide selon l'une quelconque des revendications 8 à 10 comme agent éliciteur pour la production de substances d'intérêt par le végétal traité, en particulier de resvératrol.

LISTAGE DE SEQUENCES

<110> UNIVERSITE DE BOURGOGNE
 <120> Moyens de lutte biologique contre les maladies
 cryptogamiques des végétaux.
 <130> 60873
 <160> 3
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 335
 <212> DNA
 <213> Bacillus megaterium
 <400> 1

```

acgtttggac actttgttca gttttgagag agtaatctct caattataga aagcacacta      60
ctttcttctt atttaataag aagaatattg gctgcgattg ttctttgaaa actagataac      120
agtcattgct gaggaaaagt gaaacttttc tttaatcaaa ccaataaata acacaacagt      180
atgttgtagc atttattcgc taatggttaa gttagaaagg gcgcacggtg aatgccttgg      240
cactaggagc cgatgaagga cgggactaac accgatgtgc ttcggggagc tgtaagttag      300
ctttgatccg gagatttccg aatggggaaa cccgc                                     335
  
```

<210> 2
 <211> 581
 <212> DNA
 <213> Debaryomyces hansenii
 <400> 2

```

ggatcattac agtattcttt tgccagcgct taactgcgcg gcgaaaaacc ttacacacag      60
tgtctttttg atacagaact ctgcttttgg tttggcctag agatagggtg ggccagaggt      120
ttaacaaaac acaatttaat tattttttaca gttagtcaaa ttttgaatta atcttcaaaa      180
ctttcaacaa cggatctctt ggttctcgca tcgatgaaga acgcagcgaa atgcgataag      240
taatatgaat tgcagatttt cgtgaatcat cgaatctttg aacgcacatt gcgccctctg      300
gtattccaga gggcatgcct gtttgagcgt catttctctc tcaaaccccc gggtttggtg      360
ttgagtgata ctcttagtcg gactaggcgt ttgcttgaaa agtattggca tgggtagtac      420
tagatagtgc tgcgacctc tcaatgtatt aggtttatcc aactcgttga atggtgtggc      480
gggatatttc tggatttggt ggcccggcct tacaacaacc aaacaagttt gacctcaaat      540
caggtaggaa taccgctga acttaagcat atcaataagc g                                     581
  
```

<210> 3
 <211> 581
 <212> DNA
 <213> Bacillus subtilis
 <400> 3

```

ggatccctc ctttctaagg attttaacgg aatataagac cttgggtctt ataaacagaa      060
cgttccctgt cttgtttagt tttgaaggat cattogattc ttogagatgt tgttctttga      120
  
```

aaactagata acagaagtaa ttcacattca attagtaatg caagatatca cgtagtgatt 180
ctttttaacg gttaagttag aaagggcgca cggtaggatgc cttggcacta ggagccgatg 240
aaggacggga cgaacaccga tatgcttcgg ggagctgtaa gcaagctttg atccggagat 300
ttccgaatgg gg 312